

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА НА ПРЕПАРАТЫ — АНТАГОНИСТЫ H1-ГИСТАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Савилова Анастасия Григорьевна

студент Московского Физико-Технического Института (Государственного Университета), РФ, г. Москва

Дидковский Николай Антонович

научный руководитель, д-р мед. наук, заведующий лабораторией клинической иммунологии ФГУ «НИИ физико-химической медицины» ФМБА РФ, проф. кафедры клинической иммунологии и аллергологии ММА им. И.М. Сеченова, заслуженный врач, РФ, г. Москва

1. Введение.

Изучение влияния препаратов-антагонистов H1-гистаминовых рецепторов на показатели хемилюминесценции периферической крови здоровых доноров, эффектов дозозависимости и прайминга, позволяет определить нормальные показатели и динамику хемилюминесценции. Это необходимо для диагностики индивидуальной чувствительности к препарату, в том числе — возможности развития анафилактического шока. Существующие на данный момент способы диагностики индивидуальной непереносимости лекарственных препаратов *in vivo* длительны по времени, плохо воспроизводимы и представляют определённый риск сенсibilизации и развития анафилаксии. В связи с этим большой интерес представляет разработка методов диагностики *in vitro*. Имеются данные о возможности использования в этих целях люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ). Данная методика открывает большие перспективы для изучения индивидуальной реакции организма на лекарственные препараты, подбора оптимальной терапевтической дозы. Её значимость повышается благодаря безопасности, так как проводится *in vitro*.

В последнее время внимание аллергологов привлечено к изучению терапевтических возможностей применения препаратов-антагонистов H1-гистаминовых рецепторов, в частности - препарата «Хлоропирамин», при аллергических реакциях замедленного типа. Однако для повышения эффективности и безопасности лечения необходимо иметь метод быстрого подбора терапевтических доз и определения индивидуальной чувствительности к препаратам. Для подобного использования ХЛ необходимо изучить влияние «Хлорпирамина» на её динамику и особенности, в том числе — у практически здоровых доноров.

2. Материалы и методы.

2. Материалы.

Материалом для исследования послужила кровь 18 пациентов находящихся под наблюдением в лаборатории клинической иммунологии ФГУ НИИ ФХМ ФМБА РФ по поводу вторичных иммунодефицитных состояний, не страдающих аллергическими заболеваниями. Среди них 8 мужчин, 10 женщин, средний возраст пациентов — 47 лет. Иммунодефицитное состояние в девяти случаях вызвано вирусом Эпштейна-Барр, в пяти случаях — вирусом герпеса 6 типа, и бактериальной инфекцией в четырех случаях. Нужно отметить что пол, возраст и основное заболевание не влияют на результаты данного исследования и в дальнейшем не обсуждаются.

2. Методы.

В данной работе был использован метод люминолзависимой хемилюминесценции, выполнялась процедура инкубации образцов с препаратами.

0. Инкубация с препаратами.

Сначала приготавливается рабочий раствор исследуемого препарата, образец лейкоцита делится на чётное количество частей, конкретные числа проб в каждом отдельном различается, обоснование выбора числа проб и их назначения указаны отдельно при описании методики каждого из экспериментов. Затем проводилось центрифугирование образца крови при частоте 1500 об/мин в течение 10 мин. После этого, при помощи автоматической пипетки («Ленпипет», РФ) собиралась лейкоцитарная взвесь. Затем 160 мкл лейкоцитарной взвеси и 40 мкл рабочего раствора смешивались в отдельном эппендорфе и инкубируется 20 минут при температуре 37 °С.

0. Метод люминолзависимой хемилюминесценции.

В осуществлении многих химических реакций в биологических системах участвуют радикалы кислорода и азота (ионы кислорода, оксид азота, высоко реактивные свободные радикалы, гидроксильный радикал кислорода, синглетный кислород и т. д.). Эти реакции получили название свободно-радикальных. К ним относятся реакции перекисного окисления липидов, реакции «кислородного взрыва», осуществляющие основные процессы противоинфекционного иммунитета [10]. Радикалы — весьма активные в химическом отношении частицы. Их взаимодействие сопровождается выделением значительной энергии, достаточной для образования продуктов в электронно-возбужденном состоянии и появления «сверхслабого свечения», называемого хемилюминесценцией. Наблюдаемое при свободно-радикальных реакциях в биологических системах свечение получило название «собственной» или «спонтанной» ХЛ. Так как выраженность «собственного» свечения достаточно низкая, его изучение и использование в научных и диагностических целях затруднено. Однако в присутствии активаторов ХЛ, например люминола, появление радикалов сопровождается интенсивным свечением, регистрация которого широко используется в медико-биологических и клинических исследованиях [6]. Также этому способствует создание чувствительной аппаратуры для оценки уровня свободно-радикальных процессов в клетках, тканях и органах животных и человека.

Механизм реакций люминола, приводящих к образованию возбужденных молекул продукта, включает в себя две стадии: окисление люминола, затем восстановление окисленного продукта супероксидным радикалом, либо любым другим сильным окислителем. Восстановление люминола приводит к образованию электронно-возбужденного продукта (Р*) и высвечиванию фотона [5].

Для измерения спонтанной ХЛ смешивались 20 мкл лейкоцитарной взвеси с 2 мл рабочего раствора люминола. Для приготовления рабочего раствора люминола сначала было необходимо приготовить исходный раствор — 10 мг люминола (производитель «Sigma-Aldrich», РФ) на 40 мл раствора Хенкса (производитель «ПанЭко», РФ). Затем для приготовления рабочего раствора смешивалось 1 мл исходного раствора с 9 мл раствора Хенкса. Для измерения активированной ХЛ в пробирке (производитель «Гем», РФ) смешивалась убитая культура *Staphylococcus aureus* (производитель «БЛ», РФ) с лейкоцитарной взвесью в концентрации 1:2 и затем инкубировалось в шейкере (производитель LV-1084, Латвия) в течение 10 минут при температуре 37 °С. Для регистрации данных ХЛ использовался люцинометр Lum-5773 (ООО «ДИСофт», РФ) с программным обеспечением PowerGraphProfessional, в котором записывалось изменение интенсивности ХЛ (Вольты) во времени (минуты). Регистрация данных проводилась в течение 10 минут для каждой пробы.

При интерпретации полученных данных использовались следующие обозначения:

Io — интенсивность спонтанной ХЛ;

I — интенсивность активированной ХЛ;

n — индекс влияния применяемого метода на спонтанную ХЛ;

k — индекс влияния применяемого метода на активированную ХЛ;

m — индекс активации ХЛ.

Для вычисления индексов **n** и **k** бралось отношение значения интенсивности после применения метода к исходному значению интенсивности, для получения индекса **m** — отношения показателей активированной и спонтанной ХЛ.

3. Статистическая обработка данных.

Определение статистической достоверности полученных результатов выполнено с использованием **t**-критерия Стьюдента в программе Microsoft Excel 2010.

4. Полученные результаты и их обсуждение.

Материалом для исследования послужили образцы крови 14 пациентов наблюдающихся в лаборатории клинической иммунологии ФГУ НИИ ФХМ ФМБА РФ. Для каждого пациента были определены показатели спонтанной и индуцированной хемилюминесценции, рассчитаны индексы влияния «Хлоропирамина» либо гистамина на спонтанную ХЛ, индуцированную ХЛ, и индексы активации **n**, **k**, и **m**. Выявлены статистически значимые различия вышеперечисленных индексов от контрольных значений с использованием **t**-критерия Стьюдента. Для спонтанной ХЛ, активированной ХЛ и индекса **m** статистической гипотезой является равенство средних контрольных значений и средних значений при определённой дозе препарата. Для индексов **n** и **k** статистической гипотезой является равенство средних значений минимальной дозе и средних значений при другой известной дозе препарата.

4. Влияние неспецифических факторов среды

Методика

Приготавливался рабочий раствор препарата «Хлоропирамин» (производитель НТФФ ПОЛИСАН, РФ) из расчёта 5.0, 7.5 и 10.0 мкл препарата на 1 мл крови. Затем из пробы крови была выделена лейкоцетив. Образец лейкоцетиви одновременно делился на 16 частей. Определялись показатели спонтанной и активированной ХЛ после инкубации с препаратом в течении 20 мин. Было проведено 4 серии опытов подряд, при этом время начала каждой следующей серии отличалось от времени начала предыдущей на 80 мин.

Для определения спонтанной ХЛ 40 мкл рабочего раствора в отдельном эппендорфе смешивалось с 160 мкл лейкоцетиви и инкубировались 20 минут при температуре 37 °С. При определении активированной ХЛ после 10 мин. инкубации в эппендорф добавлялись 100 мкл суспензии стафилококка, затем инкубация продолжалась 10 мин. при температуре 37 °С. Показатели ХЛ представлены в таблице 4.1.1, значения указаны в В*с.

Таблица 4.1.1

Показатели спонтанной и индуцированной ХЛ.

	Спонтанная ХЛ, В*с				Индуцированная ХЛ, В*с					
	0	80	160	240	0	80	160			
t, мин	0	80	160	240	0	80	160			
контроль	134	434	*485	297	2566	2326	3162			1
5 мкл/мл	283	216	*455	335	2255	2011	2095			1
7,5 мкл/мл	280	668	*555	458	1034	2379	2074			1
10 мкл/мл	266	324	*430	460	1132	1895	1994			1

*($p < 0,05$)

Из данных представленных в таблице можно сделать вывод о статистически значимых различиях показателей спонтанной ХЛ при прайминге длительностью 160 мин, т. е. неспецифических воздействиях, которым подвергались пробы до инкубации с препаратом.

Таблица 4.1.2

Влияния прайминга на индекс активации п.

t, мин	0	80	160	240
5,0 мкл/мл	2,12	0,50	*0,94	1,13
7,5 мкл/мл	2,10	1,54	*1,14	1,54
10,0 мкл/мл	1,99	0,75	*0,89	1,55

*($p < 0,05$)

Из данных представленных в таблице можно сделать вывод о статистически значимых различиях индекса активации при прайминге длительностью 160 мин.

4. Дозозависимый эффект.

Таблица 4.2.1

Показатели индекса активации m при различных дозах препарата.

c, мкл/мл	m
0,0	18,4
5,0	15,1
7,5	*11,7
10,0	16,4

*($p < 0,05$)

Таблица 4.2.2

Индекс влияния препарата на активированную ХЛ при различных дозах.

c, мкл/мл	k
5,0	1,0
7,5	*0,8
10,0	*0,8

*($p < 0,05$)

При концентрации препарата 7,5 мкл/мл наблюдается статистически значимое индекса активации **m**. При концентрациях препарата 7,5 мкл/мл и 10,0 мкл/мл — уменьшение индекса влияния «Хлоропирамина» на активированную ХЛ **k**.

5. Выводы.

Таким образом, на основании полученных в ходе исследования данных, можно сделать следующие выводы:

1. Препарат-антагонист Н1-рецепторов «Хлоропирамин» оказывает влияние на уровень спонтанной и активированной хемилюминесценции, выявляемое в тесте *in vitro*. Эти изменения носят дозозависимый и индивидуальный характер. При интерпретации результатов ХЛ-тестов для подбора лечебных дозировок и определения индивидуальной чувствительности необходимо опираться на интегральные показатели [коэффициент активации **m**, коэффициенты влияния препарата на спонтанную (**n**) и активированную ХЛ (**k**)], а не на абсолютные.
2. Оптимальное время инкубации с препаратом, необходимое для получения информативных данных, равно 20 минутам. Влияние неспецифических факторов (контакт с чужеродной поверхностью, деплазмирование и т. п.) на показатели ХЛ начинает проявляться к 160 минуте от забора крови.

Список литературы:

1. Бакулев А.Н., Брусиловский Л.Я., Тимаков В.Д., Шабанов А.Н.// Большая медицинская Энциклопедия М., 1959.С. 216—218.
2. Владимиров Ю.А. //Эфферентная медицина. М., 1994. С. 51—66.
3. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю. и др. // Биофизика 2006. Т. 71. С. 1215—1224.
4. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю. // Хемилюминесценция как метод обнаружения и исследования свободных радикалов в биологических системах. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. С. 13—20.
5. Герасимов А.М., Гусев В.А., Брусков О.С.// Влияние экзогенной супероксиддисмутазы и 1,4 — диазобицикло-(2,2,2) — октана на устойчивость мышечной ткани к острой кислородной интоксикации. — Бюлл. экспер. биол. мед. — 1977. — Том 83. — № 2. — С. 147—150.
6. Герасимов А.М., Корнева Е.Н., Амелина Д.Ш.// Моделирование взаимосвязи перекиси — генерирующих и НАДФН — зависимых процессов. В сб.: Окислительные ферменты животной клетки и регуляция их активности. Тез. Всер. симп. Горький. — 1978. — С. 23—24.
7. Осипов А.Н., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. //Биохимия. 2004. Т. 69. С. 103—113.
8. Ярилин А.А. // Основы иммунологии 1999 г. С. 59.
9. Ярилин А.А. // Основы иммунологии 1999 г. С. 66—69.
10. Ярилин А.А., // Основы Иммунологии 2009 г. С. 121—175.
11. Ярилин А.А. // Основы иммунологии 1999 г. С. 247—263
12. Allen R.C. //Methods Enzymol. 1986. Vol. 133. P. 449—493.
13. Vladimirov Y.A. // Free radicals in the environment, medicine and toxicology. L., 1994. P. 345—373.
14. Vladimirov Y.A., Sherstnev M.P. // Soviet medical revivs. Sect. B. Physicochemical aspect of medicine. L., 1991. Vol. 2, Pt. 5. P. 1—43.